SUMMARY

It was shown shat the development in vitro of mouse WR +/Kit^{W-Y} embryos was more effective than development of mouse B6 +/ Kit^{W-Y} embryos. It means that basic genotype is very important exposure of the same mutant gene.

The embryos carrying the mutant gene Kit^{W-Y} are less viable then the embryo with wild gene at the presence of 1% DMSO in culture medium. The abundant embryo damage of mice B6 +/Kit^{W-Y} during cryopreservation seems to be explained by a negative DMSO influence.

Литература

1. M.C. Green. Catalog of mutant genes and and polymorphic loci. Genetic variants and strains of the laboratory mouse. Oxford, 1989, 12-40.
2. B. Chabot, D.A. Stiphenson, V.M. Chapman et al. The protooncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. Nature, 1988, 335, 17, 88.
3. R.A. Fleischman. Human piebald trait resulting from a dominant negative mutant allel of the c-kit membrane receptor gene. J. Clin. Invest., 1992, 89, 1713-1717.
4. A. Malashenko. Yurlovo W suggested symbol W^{Y}. Mouse News Letters, 1976, 37, 61.
5. О.Л. Коломиец, Л.Ф. Курило, А.М. Малашенко и др. Изучение эффектов мутантного гена Dominant Spotting-Yurlovo (Kit $^{W-}$Y) на сперматогенез, раннее эмбриональное развитие и плодовитость мышей линии C57Bl/6 JY. Генетика, 2005, 41, 10, 1377-1386.
6. K.L. Loveland, S. Schlatt. Stem cell factor and c-kit in mammalian testis: Lessons originating from Mother's Nature's gene knockouts. J. Endocrinology, 1997, 153, 337-344.
7. О.П. Березовская, Л.М. Межевикина, Б.Н. Вепринцев. Метод культивирования ранних эмбрионов линейных мышей. Онтогенез, 1986, 17, 553-555.
8. Л.М. Межевикина, Т.В. Игнатьева, Б.Н. Вепринцев. Выживаемость эмбрионов крыс и мышей при низкотемпературной консервации. Онтогенез, 1988, 19, 491-494.
9. W.F. Dietrich, E.S. Lander, A.R. Moser et al. Genetic identification of Mom-1, a major modificier locus affecting Min-induced intestinal neoplasia in the mouse. Cell, 1993, 75, 631-639.
10. D.W. Threadgill, A.A. Dlugosz, L.A. Hansen et al. Science, 1995, 269, 230-234.
11. З.К. Бландова, М.П. Вахрушева, А.М. Малашенко, В.В. Осипов. Spotted sterile male – новая мутация доминантной пятнистости в 5-ой хромосоме мыши. Генетика, 1986, 22, 6, 1025-1032.
12. E. Seong, T.L. Saunders, C.L. Stewart, M. Burmeister. To knockout in 129 C57Bl/6: that is the question. Trends Genet., 2004, 20, 59-62.

Г.Н. Сингина, Л.К. Эрнст, Т.Е. Тарадайник

Всероссийский Государственный научно-исследовательский институт животноводства, Академия РАСХН, Российская академия менеджмента в животноводстве (РАМЖ)

ЗАМОРАЖИВАНИЕ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПОЛУЧЕННЫХ IN VITRO

Экстракорпоральное получение зародышей крупного рогатого скота является хорошо отработанной и рутинной технологией, широкое распространение и коммерческое использование которой во многом зависело от отработки методов замораживания. Если кратковременное хранение при плюсовых температурах только расширяет возможности манипуляций с эмбрионами, то длительное хранение в замороженном состоянии открывает возможность их транспортировки в любую точку земного шара, исключает необходимость содержания дополнительного количества реципиентов и позволяет создавать банк генетического материала высокоценных животных и исчезающих пород крупного рогатого скота.

В настоящее время в мире получено многотысячное поголовье здоровых и полноценных телят полученных после пересадки заморожено-оттаянных эмбрионов развившихся in vitro. Однако хорошо известен и тот факт, что чувствительность данных эмбрионов к процедуре охлаждения выше, а норма результативных пересадок ниже (в среднем на 10-15%), чем у in vivo аналогов. Существует достаточное количество литературы показывающей о наличии морфологических [1], ультраструктурных [2], метаболических [3] и биохимических [4] различий между этими двумя видами эмбрионов. Например, определено, что в заморожено-оттаянных эмбрионах крупного рогатого скота, полученных в результате комплексной процедуры in vitro, отмечается пониженная метаболическая активность эмбриональных клеток, уменьшение диаметра внутриклеточной массы и уровня компактизации [5, 6, 7]. Особенностью таких эмбрионов является и то, что на стадии морулы они проявляют повышенную чувствительность к замораживанию, приводящей к снижению выживаемости после про-

цедуру оттаивания [3]. Rizos с соавторами в 2002 году исследовали влияние созревания, оплодотворения ооцитов in vitro и дальнейшего культивирования эмбрионов in vitro или in vivo на пропорцию яйцеклеток достигших стадии бластоцисты и их выживаемость после хранения в жидком азоте. Эмбрионы, культивированные в организме, обнаруживали достоверно большую норму выживаемости, чем полученные in vitro. Авторы заключили, что качество ооцитов является главным фактором, влияющим на устойчивость полученных из них эмбрионов к замораживанию [10].

На успех замораживания полученных in vitro эмбрионов коров в значительной степени влияют условия их культивирования. Норма выживаемости замороженно-оттаянных эмбрионов полученных in vitro в случае культивирования в среде CR1 была выше, чем среде SOF [1]. Показано также, что добавление жирных кислот к среде CR1 содержащей 5% сыворотки повышает выживаемость полученных in vitro бластоцист [11]. Бластоцисты полученные в модифицированной среде SOF имеют более низкую норму выживаемости, чем развившиеся в сокультуре с клетками Vero [10].

Действие культуральных условий проявляется в первую очередь в количестве липидных гранул содержащихся в цитоплазме эмбрионов. Так, например, исключение липидов сыворотки вследствие замены последней на BSA способствует смягчению процедуры замораживания-оттаивания [12].

В качестве криопротекторов для замораживания эмбрионов полученных in vitro в основном используют глицирин (10%) и этиленгликоль (1,5-1,8 М). Окончательного мнения о том, какой из указанных веществ лучше нет. В значительной степени использование того или иного криопротектора определяется культуральной системой, в которой происходит развитие эмбрионов. Показано, что выживаемость замороженных в 10% глицирине эмбрионов культивированных в среде определенного состава содержащей инсулиноподобный фактор роста выше, нежели при использовании стандартного протокола с использованием комплексной среды и сыворотки [10]. Pereira R.M. и др. (2004) обнаружили достоверные различия в проценте результативных пересадок после замораживания в глицерине или этиленгликоле, показав, что последний более пригоден для замораживания эмбрионов полученных in vitro.

В большинстве зарубежных лабораторий занимающихся производством эмбрионов крупного рогатого скота существуют стандартные протоколы получения in vitro зародышей различных стадий и их длительного хранения. В нашей стране основные работы в данном направлении проводились до 1991 года. Однако изменившиеся в это время экономические условия привели к фактическому прекращению исследований. В дальнейшем отдельные авторы делали попытки по совершенствованию данного метода, но они, как правило, не выходили за рамки определенной диссертационной темы и не ставили своей целью практическое внедрение технологии.

В отделе биотехнологии Всероссийского Научно-исследовательского Института животноводства в 2005 году начата работа по отработке и усовершенствованию технологии экстракорпорального получения зародышей крупного рогатого скота (IVM/IVF/IVC) и созданию банка эмбрионов высокопродуктивных и племенных коров, а также эмбрионов от животных с неустановленным происхождением.

Согласно протоколу ооцит-кумулюсные комплексы дозревают в модифицированной среде ТСМ-199 с 10% FCS, содержащей 10 мкг/мл ФСГ и 1 мкг/ эстрадиола в течение 24 часов в условиях инкубатора при 5% CO_2 в воздухе и максимальной влажности. Для оплодотворения созревшие ооциты соинкубируются с, подготовленной методом Swim-up спермой быков, в среде Fert-Talp в течение 18-20 часов.

После совместного культивирования, отмытые от лишних сперматозоидов и кумулюсных клеток предполагаемые зиготы, переносятся на монослой клеток яйцевода (в присутствии ТСМ-199 с 10% FCS) или в среду CR1aa. Полученные на 7-8 день эмбрионы замораживаются с использованием того же метода, что и для зародышей после суперовуляции. В качестве криопротектора используется 1,5 М раствор этиленгликоля. Эмбрионы из среды развития переносятся в раствор криопротектора на 5 минут. После этого производится заправка в пайетты: центральный столбик длинной не более 1 сантиметра – раствор криопротектора с эмбрионами, с двух сторон ограниченный пузырьками (каждый длинной 5 мм с учетом сжатия после закрытия пробкой и в процессе охлаждения), ограничивающие столбики – среда ФСБ с сывороткой крови, – до полного заполнения пайетты. Заправленные пайетты сначала охлаждаются над парами азота, удерживанием их в области гор-

ловины сосуда Дьюара не более 5 минут. После этого помещаются в жидкий азот для длительного хранения. Процесс оттаивания заключается в выдержке эмбрионов в течение 8-12 секунд при комнатной температуре (порядка 20° С), затем в водяной бане при 30° С в течение 10-12 секунд. В настоящее время проводится работа по оценке эффективности данного способа. Однако предварительные данные на небольшом количестве эмбрионов показывают более 20% развитие до стадии реэкспандированной бластоцисты после кратковременного культивирования.

SUMMARY

Although frozen-thawed in vitro embryos have resulted in the birth of many thousand of normal healthy calves, it is established that such embryos are much more sensitive to freezing than in vivo-derived embryos. Pregnancy rates such embryos are generally lower than those reported for in vivo-derived. There are many well-documented differences at the morphological, ultrastructural, metabolic, biochemical level between the two categories of embryos. Chilling of in vitro derived bovine embryos depends on their developmental stage, culture conditions and on presence of numerous lipid droplets in their cytoplasm.

Литература

1. Holm P., Callesen H.In vivo versus in vitro produced bovine ova: similarities and differences relevant for practication application.Reprod. Nutr. Dev. 1998, v. 38. 579-594.
2. Fair T. et al. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. Mol Reprod.Dev. 2001. v. 58. 186-195.
3. Pollard, J.W.; Leibo, S.P. Chiling sensitivity of mammalian embryos.Theriogenology. 1994. v. 41. 101-106.
4. Massip, A et.al. A. Morphology and biochemistry of in vitro-produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. Hum. Reprod., v. 10. 3004.
5. Rieger D, Pollard JW, Leibo SP. The effect of cryopreservation on the metabolic activity of in vitro produced cattle blastocyst.Cryobiology. 1993. 30. 631.
6. Partridge RJ.et.al. Glucose uptake and lactate production by single frozen-thawed bovine embryos produced in vivo or by in vitro fertilisation. J Reprod. Fert. 1995. 13. 41.
7. Khurana NK, Niemann H. Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived in vitro or in vivo. Theriogenology. 2000. 54. 313-326.
8. Rizos D. et.al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. Mol. Reprod. Dev. 2002. 61. 234-248.
9. Rizos D. et. al. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. Biol Reprod 2002. 66. 589–95.
10. Gordon. I. Laboratory production of cattle embryos. 2003.
11. Imai K. et. al. Different factors affect developmental competence and cryotolerance in in vitro produced bovine embryos. 2002. 64 (10). 887-891.
12. Sang-Rae Cho. Enhanced Cryosurvival of Bovine Blastocysts Produced in Vitro in Serum-Free Medium Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2002 V. 19 (10). 487-492.
13. Pereira R.M. et.al. Post-thawing resistance of bovine embryos is improved by trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (CLA). 15th Inter.Congress on animal Reprod. 8-12 Aug. 2004. v. 2. 538.

В.В. Тимон, Т.Ф. Петренко, Е.И. Гончарук

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА В СРЕДЕ, НЕ СОДЕРЖАЩЕЙ КРИОПРОТЕКТОРОВ

В деле сохранения генетических ресурсов млекопитающих и, в частности, человека, ключевую позицию занимает вопрос создания низкотемпературных банков хранения биологических объектов. Одной из базовых задач существования банков является разработка оптимальных способов низкотемпературного хранения клеток и тканей, что включает в себя, как раздел, отработку максимально щадящих сред криоконсервирования и сокращение манипуляций с материалом на этапе деконсервации [3].

В медицинской практике широкое применение в последние десятилетия приобрели биотехнологические методы, и особенно клеточная терапия [5]. Создаются хранилища аутологичных крови, стволовых клеток, специализированных клеток, в частности, фибробластов и т.д.[3, 6] Стратегия лечения может требовать неоднократного введения клеточного материала, поэтому возникает необходимость в криоконсервировании. Для внутривенного введения не разрешены протекторы, стандартно используемые в криобиологической практике, что предполагает обязательное их удаление перед применени-